

Microstructural changes of cows' uterus in an infection caused by *Haemophilus somnus*

Mikroštruktúrne zmeny maternice kráv pri infekcii spôsobenej *Haemophilus somnus*

Danka ŠŤASTNÁ* and Pavel ŠŤASTNÝ

Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Slovenská poľnohospodárska univerzita Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika, tel. +421-37-641 4272, danka.stastna@uniag.sk *correspondence

Abstract

The reproductive form of Haemophilic infection caused by a microorganism *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) is in our conditions practically unknown and undiscovered disease of cow reproductive organs. The aim of this work was based on experimental work to provide a comprehensive view on the patho-histological and submicroscopic changes in the uterus of 60 cows, serological positive, crossbreeds Slovenské strakaté x Holstein, aged 3.5 – 4.5 years, serological positive, which were up to 90 days after the parturition sterile. After the hormonal control of the oestrus cycle (PGF₂α-Oestrophan SPOFA) the cows were inseminated and the non-gravid cows later killed. The reproductive organs of killed animals were pathologically – anatomically dissected with following histological and sub-microscopic study of uterus and cervix tissue. At the beginning of the experiment no clinical changes of the reproductive organs of group 1 animals with the titer of antibodies 1:25-100 were diagnosed and in group 3 with the titer 1:25. At an examination before killing were examined endometritis (EM) of grade II. and vaginitis with vestibulitis in these groups. At the rest of animals appeared in every level of the titer of antibodies of EM II. and EM III. EM I. were not clinically diagnosed. Dissecting examination determined EM catarrhalis and cervicis catarrhalis in all groups. The histological examination pointed to EM catarrhalis chronica, EM interstitialis chronica, EM fibrosis and cervicis catarrhalis chronica. The leucocytes gained from a uterus lavage were in a comparison with stroma leucocytes mostly polynuclear (neutrophils) and in smaller amount small forms of lymphocytes. At long-term sterility of cows, because of possible *H. somnus* infection, we regard as priority the serodiagnostics at which is taken into consideration any level of the titer of antibodies.

Keywords: cattle, haemophilic infection, *Haemophilus somnus*, reproduction, submicroscopic changes, uterus

Abstrakt

Reprodukčná forma haemofilovej infekcie spôsobená mikroorganizmom *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) je v našich podmienkach neznáma choroba reprodukčných orgánov kráv. Cieľom práce bolo na základe experimentálnych prác podať ucelený pohľad na patologicko-histologické a submikroskopické zmeny maternice 60 kráv, serologicky pozitívnych, krížencov plemien Slovenské strakaté a Holštajnské, vo veku 3.5 až 4.5 roka, serologicky pozitívnych, ktoré boli po ostatnom pôrode aj napriek opakovaným insemináciám negravidné viac ako 90 dní. Po hormonálnej kontrole estrálneho cyklu (PGF2 α –Oestrophan SPOFA) boli kravy inseminované a negravidné kravy zabité. Reprodukčné orgány zabitých zvierat boli vypitvané a patologicky - anatomicky vyšetrené s nasledujúcou histologickou a submikroskopickou štúdiou tkaniva maternice a krčka maternice. Na začiatku experimentu neboli diagnostikované žiadne klinické zmeny reprodukčných orgánov zvierat zo skupiny 1 s titrom protilátok 1:25 -100 a v skupine 3 s titrom 1:25. Pri vyšetrení pred zabitím boli zistené endometritídy (EM) II. stupňa a vaginitídy s vestibulitídami v týchto skupinách. Pri ostatných zvieratách sa zistili pri každej úrovni titra protilátok EM II. a EM III. EM I. neboli klinicky diagnostikované. Pitvou sa zistili EM. catarrhalis a cervicis catarrhalis vo všetkých skupinách. Histologickým vyšetrením sa zistili EM. catarrhalis chronica, EM interstitialis chronica, EM. fibrosis a cervicis catarrhalis chronica. Leukocyty získané z maternice lavážou boli väčšinou polynukleáry (neutrofilny) a v menšom množstve malé formy lymfocytov. Pri dlhodobej neplodnosti kráv, z dôvodu možnej *H. somnus* infekcie, považujeme za prioritu serodiagnostiku, v ktorej sa berie do úvahy akákoľvek úroveň titra protilátok.

Keywords: *Haemophilus somnus*, hemofilová infekcia, hovädzí dobytok, maternica, reprodukcia, submikroskopické zmeny

Detailed abstract in English

The reproductive form of *Haemophilic* infection caused by a microorganism *Haemophilus somnus* (*Histophilus somni*) is in our conditions practically unknown and undiscovered disease of cow reproductive organs. Therefore, on the basis of experimental works, we tried to provide a complete overview on histologic and sub-microscopic changes of cow uterus of 60 cows, serological positive, crossbreeds Slovenské strakaté x Holstein, aged 3.5 – 4.5 years, which were up to 90 days after the parturition sterile. After the hormonal control of the oestrus cycle (PGF2 α -Oestrophan SPOFA) the cows were inseminated and the non-gravid cows later killed. The reproductive organs of killed animals were dissected with following histological and sub-microscopic study of uterus and cervix tissue. Samples from the mucose of the uterus and the cervix of cows were taken immediately after they were slaughtered and then they were fixated in 10 % formalin (24 hours). Samples dehydrated by alcohol, acetone and xylene, were treated by xylene-paraffin and embedded to paraffin. Samples were cut into 7-8 μ m histological slices. The slices were coloured with Hematoxyline - eozine based on the method by Masson. Histological specimens were evaluated microscopically. For sub-microscopic studies the samples of mucose were fixated in 4 % glutaraldehyde (2 hours) and in 1 % Osmium tetraoxyde (1 hour). 0.1M cacodylate buffer was used for washing. The samples were embedded into Durcupane. The semi-thick

(1µm) and ultra-thin slices were cut by ultramicrotome with glass knives. Semi-thick slices were stained by Toluidine blue. The ultra-thin slices placed on an electrolytic mesh were contrasted by uranyl-acetate (2 %) and by lead citrate. The ultra-thin slices were observed with electron microscope. For the electron scanning microscopy the samples of mucose were fixated in 3 % glutaraldehyde (24 hours) and in 1 % Osmium tetraoxyde (1 hour). After acetone dehydration the samples were desiccated by critical point method with the use of CO₂. Then they were coated with gold (20nm) in PLARON coating device. The slices were controlled with the use of scanning electron microscope at 25KV. At the beginning of the experiment no clinical changes of the reproductive organs of group 1 animals with the titer of antibodies 1:25-100 were diagnosed and in group 3 with the titer 1:25, at an examination before killing were examined endometritis (EM) of grade II. and vaginitis(V) with vestibulitis (VS) in these groups. At the rest of animals appeared in every level of the titer of antibodies of EM II. and EM III. EM I. were not clinically diagnosed. Dissection examination determined EM catarrhalis and cervicis catarrhalis in all groups. Among microscopic changes were present in endometrium: oedema in the epithelium layer of the endometrium, stroma, uterus glands and blood capillaries. Erosions and desquamations were determined in the epithelium layer of endometrium and in cervix epithelium. In the stroma of endometrium were sub-epithelial, interstitial and perivascular infiltrations mostly of mononuclear character. Oedema of endothelium cells was in the interstitium. On the surface of the epithelium were determined fibrin coating of reticular character, leucodiapedese, haemostase, leucocytic thrombus, post-inflammatory pseudoxantom, plasmatic cells and histiocyties appeared. Among the sub-microscopic changes were determined: oedema of secretory and glandular epithelium cells, extension of nucleo-cytoplasmic ratio, caryolysis, caryorexis, hyperchromatosis, cisternies of rough endoplasmic reticulum, dilatation of mitochondria, lot of cytoplasmic membrane vesicles, significant hypertrophy of secretory luminal epithelium cells. The leucocytes gained from a uterus lavage were in a comparison with stroma leucocytes mostly polynuclear (neutrophils) and in smaller amount small forms of lymfocytes. At long-term sterility of cows, because of possible Haemophilic infection, we regard as priority the serodiagnostics at which is taken into consideration any level of the titer of antibodies against *H. somnus* with respect to the phase of the oestrus cycle and in the case of a determined titer to execute an isolation of the infection causal organism. As pathognomic report at histopathological examination we consider for EM. catarrhalis chronica of Haemophilic origin the hypertrophy of secretory epithelium, its desquamation, oedema of endothelium cells, pavimetation, mixed infiltration of stroma with dominance of mononuclears and dominance of not fixed leucocytes in the lavage endometrium secretion. For the EM II. apart from the mentioned above are typical the fibrin coatings on luminal epithelium, fibrin in uterus glands, and present leucocytic thrombus. With regard to the determined mixed infection we cannot take an unequivocal stand to the EM III. For the cervicitis of Haemophilic origin we consider as pathognomonic the polypous hypetrophy of the cervix epithelium, infiltration of sub-epithelial layer and perivascular leucocytic infiltration with a dominance of mononuclears, desquamation and erosion of the cervix epithelium. The work clearly concludes that in cattle breeding abroad and in Slovakia as well appear infections of reproductive organs of Haemophilic origin which are often at higher level of inflammation process covered by other bacteria, in other words permanent reproductive microflora and as a result of this fact the pathological states are related to them. At long-term treated and relapsing endometritis, long-term

sterility without clinical changes evoking the endometritis and repeating catarrhal vaginitis there should be as a natural thing a test for a presence of antibodies against *Haemophilus somnus* and its microbiological proof.

Keywords: cattle, haemophilic infection, *Haemophilus somnus*, reproduction, submicroscopic changes, uterus

Úvod

Prvé informácie o hemofilovej infekcii, ako príčine abortu kráv pochádzajú z roku 1975. Chládek(1975) popisuje lokálne nekrotické zmeny placenty, lokalizované v epiteli kotyledónov choria a masívny výskyt polymorfonukleárných leukocytov v placente a v tkanive bronchiolov abortovaného feta. *Haemophilus somnus* (*H.somnus*) novšie tiež *Histophilus somni* je Gram-negatívny, nepohyblivý, nesporelujúci, nekapsulárny, pleomorfný kokobacil, spravidla sférického tvaru (Tam, 2011). *H.somnus* je považovaný za príležitostného patogéna a komenzála slizníc hovädzieho dobytku (Challacombe et al., 2006), oviec (Palomares et al.,2005; Ward et al., 2006), kôz (Janosi et al., 2009). *H. somnus* je baktéria spôsobujúca infekciu, ktorá sa šíri v stáde dobytku veľmi skrytým spôsobom (Richey, 2002). Obyčajne je hlavný problém v tom, že sa choroba vyvíja dlho pred jej zistením („sleeping sickness“), (Van Donkersgoed et al., 1990). V podstate ide o subklinické formy infekcie, ktoré môžu dlhodobo zastierať skutočný stav, ktorý sa dá odhaliť cez kontrolu voľných tzv. zápalových buniek (neutrofilov, lymfocytov, monocytov) zo získaných sekrétov maternice. Cheong et al.,(2008) takto zistili na 30 farmách dojníc z problémových kráv až 80 % výskyt subklinickej endometritídy. *Haemophilosis* môže prebiehať aj ako zmiešaná forma, vyskytujúca sa na viacerých orgánoch (Richey, 2002). Všeobecne sa dá povedať, že *H. somnus complex* je klinicky zjavná reprodukčná a močová forma (Janzen, 2012), dýchacia forma, septikemická forma, a celková forma ("catchall") s pestrou klinikou (Van Donkersgoed et al., 1990). Ak *H. somnus* atakuje reprodukčný trakt gravidných kráv, infekcia môže vyústiť do odumretia plodu v akomkoľvek veku, má embryocídny účinok (Kwiecien and Little, 1991) s následným abortom a infekciou maternice. O tom, či môže *H.somnus* vyvolať infekciu genitálií ako komenzál, sa viedli polemiky z dôvodu jeho výskytu a izolácií z genitálií kráv postihnutých, ale aj zdravých (Corbeil et al.,1986; Stephens et al.,1986). Častejší výskyt infekcie *H.somnus* v čistej či zmiešanej forme v reprodukčných orgánoch bol však zistený predsa len pri zápalových procesoch (Corbeil et al.,1986; Sassi et al.,2010). Šnirc et al.,(1992) v chovoch dojníc so zvýšeným výskytom klinických puerperálnych endometritíd po retencii sekundín (9.7-13.4 %), ale aj po bezproblémovom peripartálnom období (12.8 – 36.3 %) zistili mikroaglutinačným testom pri 310 prešetrovaných dojniciach 8.0 – 32.6 % prípadov špecifických protilátok proti *H. somnus*. Aj nízke titre okolo 1:24 signalizujú problémovú reprodukciu sprevádzanú reprodukčnými stratami (Šnirc et al.,1992). V kontrolovanom stáde 112 kráv so 63.77 % výskytom titra protilátok 1:24 proti *H. somnus* sa vyskytlo 11.2 % retencií sekundín, 21 % klinických endometritíd a nízke bolo aj percento teľnosti po prvej inseminácii (34.7 %). Existujú práce pri ktorých bol priemerný titer relatívne nízky (1:3.6 -1:36.8) a bol zistený rozsiahly patologický obraz (Hoblet et al., 1989; Šťastný et al., 1994) a existujú tiež práce, v ktorých sa napriek vysokému titru nezistili klinické zmeny na reprodukčných orgánoch (Kaneene et al., 1986 a,b,1987). Mikroorganizmus je vylučovaný maternicovo/vaginálnym výlučkom a močom z infikovaných zvierat (Last, et al., 2001; Richey, 2002).*H. somnus*, ktorý spôsobuje infekciu, adheruje na endotel ciev,

vytvorí ich kontrakciu, obnaží kolagén, spôsobí tiež adhéziu krvných platničiek (trombocytov) a formovanie trombusov. Primárny mechanizmus infekcie pravdepodobne skôr zapríčini tvorbu trombusov ciev ako tromboembolizmus. Niektoré bakteriálne kmene môžu adherovať na endotel ciev pohrudnice, myokardu, perikardu, synoviálneho puzdra, alebo na mnoho iných tkanív (Janzen, 2012) Prerušenie toku krvi vyvolá v týchto oblastiach infarkt s deštrukciou tkaniva a formovaním nekrotického sekvestra. Z experimentálnych infekcií genitálií vyplýva, že *H. somnus* môže vyvolať zápalové procesy každého úseku genitálií kráv rôznej intenzity a rôzne pretrvávajúce, pretože boli zistené supuratívne vaginitídy, vestibulárne adenitídy a squamózne metaplázie vestibulárnych žliaz až 5 týždňov po inokulácii. Potvrdili to aj izoláty *H. somnus*. Aj počas gravidity môžu byť vagina a vulva osídlené *H. somnus*, keďže je jeho zdroj práve vo vestibulárnych žľazách (Miller et al., 1983; Šťastný et al., 1994) a mimo gravidity v celom reprodukčnom trakte. Ako vidieť z experimentálnej infekcie (Šťastný et al., 1994) pravdepodobne prežíva *H. somnus* počas gravidity aj v maternici, pretože bezprostredne po pôrode bolo možné získať čistú kultúru *H. somnus* priamo z uteru. Cieľom práce bolo na základe experimentálnych prác podať ucelený pohľad na patologicko-histologické a submikroskopické zmeny maternice kráv serologicky pozitívnych na hemofilovú infekciu.

Materiál a metodika

Do experimentu bolo zaradených 60 kráv, krížencov plemien Slovenské strakaté a Holštajnské, vo veku 3.5 – 4.5 roka, ktoré boli po ostatnom pôrode aj napriek opakovaným insemináciám negravidné viac ako 90 dní. Pri všetkých zvieratách bolo vykonané klinické gynekologické, serologické vyšetrenie na protilátky proti *Histophilus somni*(*Hs*) a mikrobiologické vyšetrenie. Zvieratá boli rozdelené do troch skupín. Prvá skupinu (25 kráv) bola bez pozitívneho gynekologického nálezu s titrom protilátok proti *Hs* od 1:25 do 1:100 (13 kráv) a s titrom > 1:100 (12 kráv). Druhá skupina (24 kráv) mala pozitívny gynekologický nález s titrom protilátok proti *Hs* 1:25 - 1:100 (11kráv) a titrom > 1:100 (13 kráv).Tretia skupina (11 kráv) s gynekologickým a serologickým negatívnym nálezom. Za serologicky negatívne kravy sa považovali s titrom < 1:25. Gynekologické vyšetrenie bolo opakovane vykonané 3x v 7 dňových intervaloch a pred zabitím. Kravy prvej a tretej skupiny boli v luteálnej fáze cyklu ošetrené PGF_{2α} (Oestrophan SPOFA) a inseminované. Zvieratá, pri ktorých sa opakovala ruja, alebo na 56.-60. deň po inseminácii boli negravidné, boli zabitú. Kravy, ktoré koncipovali boli sledované do abortu, alebo pôrodu. Zvieratá druhej skupiny s pozitívnym gynekologickým nálezom a titrom protilátok vyšším ako 1:25 boli zabitú bez ošetrenia. Pohlavné orgány zabitú kráv boli ihneď po vykvrvení exenterované rezom v *linea alba*. Z rohu maternice, krčka maternice sa odoberali vzorky sliznice pre histologické a submikroskopické štúdie. Vzorky pre histológiu mali veľkosť 7x7 mm, boli fixované v 10% formole. Po odvodnení v alkohole, acetóne a xyléne boli vzorky ošetrené xylén parafínom a zaliate do parafínových bločkov, z ktorých sa rezali 7 - 8 mikrónov hrubé histologické rezy. Tie boli farbené Hematoxylin-eozinom a metódou podľa Massona (zelený trichróm). Histologické preparáty boli vyhodnocované mikroskopicky (Olympus Provis AX) programom viazaným pre hodnotenie jednotlivých morfológických štruktúr Statgraphics ver.7, Image ProPlus (Spectra Services Inc, NY) a MS Excel 2000. Pre submikroskopické štúdie sa odoberala sliznica rohu maternice a krčka maternice po ponorení tkaniva do 4% glutaraldehydu, v ktorom sa rezy fixovali 2 hodiny a 1 hodinu v 1% Osmium tetraoxyde. Premývané boli 0.1 M kakodylátovým pufrom. Odvodnené vzorky v acetóne boli zaliate do Durcupanu. Pomocou sklenených nožov sa pripravili

polohrubé rezy (1µm) a ultratenké rezy na ultramikrotóme (LKB 8800 III, Švédsko). Polohrubé rezy sa ofarbili toluidinovou modrou. Ultratenké rezy boli na elektrolytickej sieťke kontrastované 2% uranylacetátom a citrátom olova. Ultratenké rezy boli mikroskopované na elektrónovom mikroskope TESLA BS 500 (ČSSR). Pre elektrónovú scanning mikroskopiu boli vzorky fixované v 3 % glutaraldehyde 24 hodín a v 1 % osmium tetraoxyde 1 hodinu. Po odvodnení v rade acetónov boli vysušané metódou kritického bodu sušenia v prístroji CPD POLARON (Quorum Technologies LTD Anglicko) pomocou CO₂. Vysušené preparáty sa následne pokovovali 20nm vrstvou zlata v pokovovacom zariadení (POLARON). Preparáty sa mikroskopovali na scanning elektrónovým mikroskopom TESLA BS 301 (ČSSR) pri 25KV.

Výsledky

Zistený patologický obraz poukazuje na isté nepresnosti v klinickej gynekologickej diagnostike pri zmenách na maternici. V porovnaní s posledným vyšetrením pred zabitím sa zistili rozdiely v diagnostike endometritíd (tab. 1).

Histologické a submikroskopické zmeny endometria

Pre tieto analýzy boli zvieratá zlúčené do 3 skupín podľa úrovne titra protilátok. V endometriu kráv s titrom protilátok < 1:25 bola najmenšia frekvencia zmien.

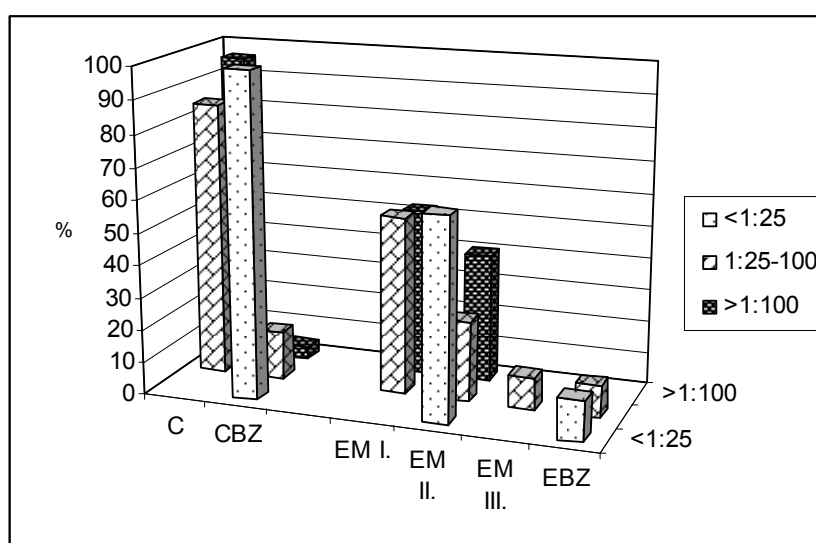
Tabuľka 1. Frekvencia patologických stavov pohlavných orgánov kráv na začiatku experimentu a pred zabitím (v %)

Table 1. Frequency of the pathological states of cows reproduction organs at start of trial and before slaughter (in %)

Group	Titer	No of cows								
			EM	C	V	VS	O	EM I.	EM II.	EM III.
1	1:25-100	13*	-	-	-	-	-	-	-	-
	1:25-100	9	55.5	55.5	88.8	66.6	11.1	60	40	-
	> 1:100	12*	25	-	58.3	66.66	16.66	-	66.66	33.33
	> 1:100	12	66.6	83.3	83.3	91.6	16.6	75	25	-
2	1:25-100	11*	54.54	-	81.82	72.73	45.46	-	33.33	66.67
	1:25-100	11	72.7	100	72.7	90.9	45.5	37.5	37.5	25
	> 1:100	13*	61.54	-	53.85	61.54	46.15	-	75	25
	> 1:100	13	84.6	100	100	100	53.8	9.1	72.7	18.2
3	< 1:25	11*	-	-	-	-	-	-	-	-
	< 1:25	8	62.5	-	37.5	37.5	37.4	-	62.5	-

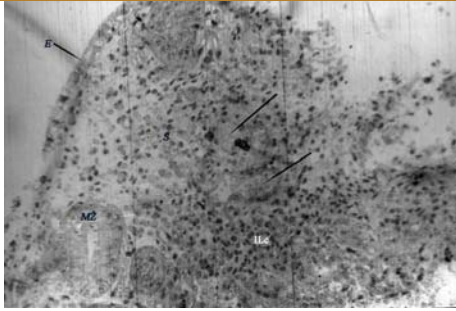
*control at start of trial; EM-endometritis; C-cervicitis; V-vaginitis; VS-vestibulitis; O-changes of ovary; I.-III.-degree of endometritis;

Pri EM I. stupňa (obr. 1) sa zistila atrofia epitelu endometria (obr. 2) s povrchovou eróziou (obr. 3) a infiltráciou strómy mononukleárnymi leukocytmi (tabuľka 2). Najviac bolo prítomných malých lymfocytov s priemerom do $9\mu\text{m}$ (120 ± 1). Zistili sme tiež menej histiocytov (8 ± 1) a plazmatických buniek (5.04 ± 1 ; tabuľka 2). Zmeny uvedené v tabuľke 2 sa pri EM I. vyskytovali menej v rozsahu 50 -100 %, ale pri EM II. boli zmeny pestrejšie s výskytom 20 -100 %. S titrom protilátok 1:25 -1:100 boli zistené predovšetkým EM I. a EM II., menej EM III. (obr. 1). Pri katarálnej chronickej EM sa vyskytla atrofia luminálneho epitelu. Výrazná bola aj hypertrofia sekrečného epitelu a povrchová erózia epitelu (obr. 3) s perforáciou cytoplazmatickej membrány a desquamáciou epitelu, ktorá postihovala značné plochy povrchu endometria, pri obnažení bazálnej membrány (obr. 4). Charakteristickou črtou endometria všetkých zvierat bola peristatická hyperémia, infiltrácia strómy mononukleárnymi (obr. 2) a perivaskulárne infiltrácie. Proliferácia endometria a pavimetácia, edém endotelu ciev (obr. 7), hypertrofia žľazového epitelu a dilatácia lumenu žliaz boli pozorované zriedkavejšie (tabuľka 2) a jedna tretina zvierat mala zvýšený výskyt polynukleárných leukocytov.



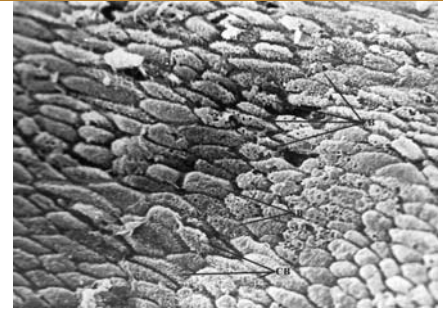
Obrázok 1. Endometritis a Cervicitis -% (histologicky potvrdené, C-cervix, CBZ-cervix bez zmien, EM I.-III. typu, EBZ-endometrium bez zmien).

Figure 1. Endometritis and Cervicitis -% (histological confirmed, C-cervix, CBZ-cervix without changes, EM I.-III.type of endometritis, EBZ-endometrium without changes).



Obrázok 2. (Figure 2)

Obrázok 2. Atrofia epitelu endometria (E) pri *E. catarrhalis chronica*; infiltrácia strómy leukocytmí (ILC), krvné cievy – hemostáza (šípky), toluidinová modrá, ZV.x2600.



Obrázok 3. (Figure 3)

Obrázok 3. Erózia epitelu endometria pri *E. catarrhalis chronica*; EB-erózia buniek, SB-Sekrečné bunky, CB-ciliárne bunky, SEM, pokovené zlatom, zv. X7600.

Figure 2 Atrophy of endometriums` epitel (E) in the *E.catarrhalis chronica*; infiltration by leucocytes (ILc), haemostasis (arrovs), Toluidine blue, mag.x2600.

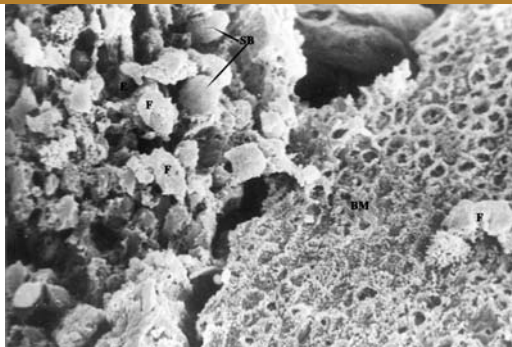
Figure 3 Epiteliums erosis in the *E.catarrhalis chronica*; EB- cells erosis, SB secretory cells, CB- ciliare cells, SEM, coat by gold, Mgn.x7600.

Submikroskopické zmeny endometria pri titre protilátok 1:25 -1:100 (tabuľka 2) sú charakteristické pre jednotlivé typy EM a vyskytujú sa v celej škále. Pri EM II. sa pri všetkých postihnutých zvieratách vyskytovala hypertrofia sekrečného epitelu a epitelu žliaz , pavimetácia a dilatácia lumenu žliaz. Menší bol výskyt trombusov (obr. 5), pozápalového pseudoxantómu a leukocytov v žľazách.

Tabuľka 2. Frekvencia histologických a submikroskopických zmien v endometriu pri rôznej hladine titra protilátok (v %)

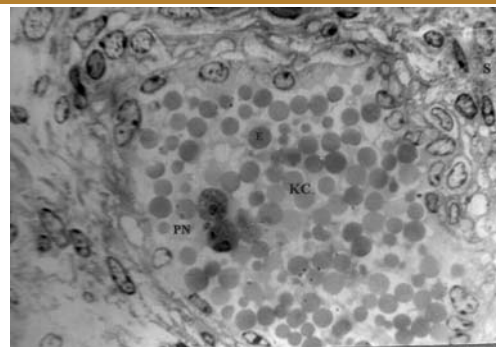
Table 2 The frequency of histological and submicroscopic changes in the endometrium at different levels of antibody titers (in %)

The changes	< 1:25		1:25-100				> 1:100			
	I.	II.	I.	II.	III.	F	I.	II.	III.	F
Proliferation of the endometrium		100	81.8	100	100	100	100	100	100	100
Hypertrophy of the secretory epithelium		100	81.8	100	100	100	100	100	100	100
Epitelial erosion	100		81.8	40		100	84.6	30		100
Desquamation of the epithelium			72.7	60	50	60	84.6	70	100	70
Atrophy of the epithelium	100		18.2							
Fibrin coating				60		100		70		100
Fibrin in the stroma				60		60		40		100
Peristatic hyperemia		25	100	100	100	100	100	100	100	100
Infiltration of the stroma by PN		100	36.4	40	100		30.8	40	100	
Infiltration of the stroma by MN	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Perivascular infiltration		60	100	100	100	100	100	100	100	100
Pavimetation			81.8	100	100	100	84.6	100	100	100
Pseudoxantóm				20			15.3	20		
Endotelial edema			54.5	60	50	100	61.5	50	100	60
Thrombus			9.1	60	50		61.5	70	50	40
Hypertrophy of the glandular epithelium		40	63.6	100	100	100	69.2	70	100	42.8
Dilatation of the lumen of glands			54.5	100	100	100	61.5	100	100	42.8
Leukocytes in the glands				20	100		15	40	100	
Low cells density	50	20	63.6	40	50	69.2	70	50		
Dilation of the mitochondria			36.4	40	50		30.8	30	50	
Cisternae of GER		20	63.6	40	50		61.5	80		
Vesiculs			45.5	40	100	20	38.5	60	100	40
Cytoplasmic vacuolation		20	63.6	80	100	100	69.2	80	100	20
Pyknosis		40	90.9	100	100	100	84.6	100	100	100
Karyolysis	50	20	45.5	60	100	60	53.1	60	100	40
Karyorhexia	50		27.3	60	100	60	61.5	50	50	50
Hyperchromatosis		20	27.3	40	100	40	30.8	40	50	40
No changes	12.5		10							



Obrázok 4. (Figure 4.)

Obrázok 4. Deskvamácia epitelu endometria; (BM) bazálna membrána, SB-sekrečné bunky, F-fibrín, SEM, pokovené zlatom, zv.x9200.

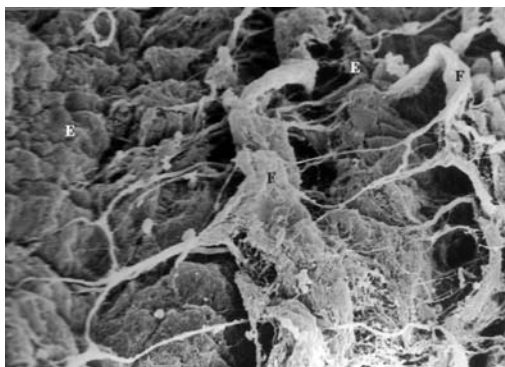


Obrázok 5. (Figure 5.)

Obrázok 5. Hemostáza – trombus v krvnej cievke (Kc) pri EM. catarrhalis chonica; polynukleárny leukocyt (PN), erytrocyt (E), toluidínová modrá, zv. x1000.

Figure 4. Desquamation of endometrium's epithel; (BM)basal membrane, SB-secretory cells, F-fibrin, SEM, coating by gold, mag.x9200.

Figure 5. Haemostasis - trombus of blood vessel (Kc) in EM. catarrhalis chonica; polynuclear leukocyte(PN), erythrocyte(E), Toluidine blue, mag. x1000.



Obrázok 6. (Figure 6.)

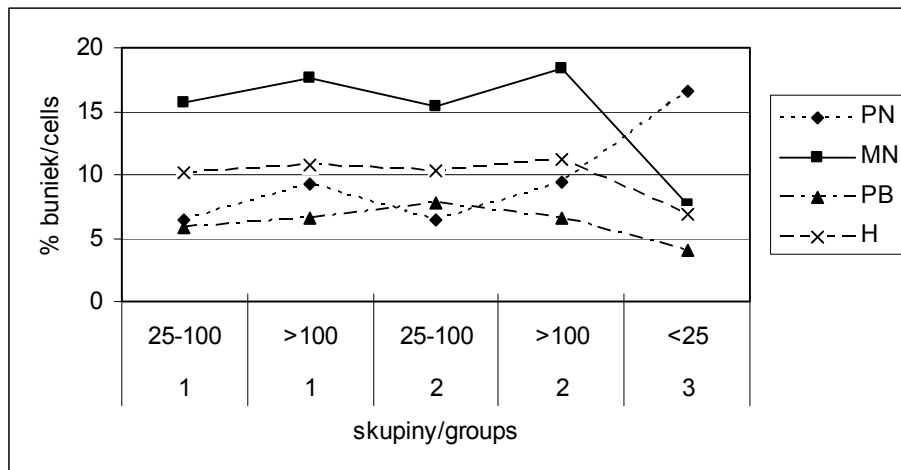
Obrázok 6. Povrch endometria s fibrínovým krytom pri EM II.; endometrium (E), fibrin (F), SEM, pokovené zlatom Zv.x4360.

Obrázok 7. Edém bunky endotelu pri EM III.; nucleus (J), mitochondria (M), vakuola (V), citrát olova, uranylacetát, TEM, zv. x2000.

Figure 6. Endometrium's surface with fibrin's cover in EM II.; endometrium (E), fibrin (F),SEM, coating by gold,mag. x4360.

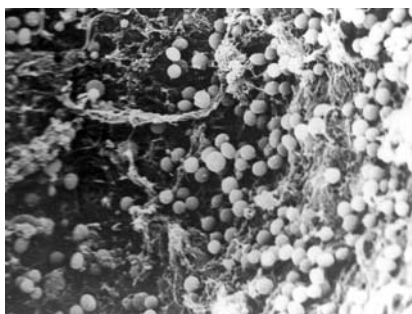
Figure 7. Oedema of endotel cell in EM III.; nucleus (J), mitochondria (M), vakuole (V), Leads` citrate, uranylacetate, TEM,mag.x2000.

Na endometriu boli prítomné fibrínové nálepy, ktoré miestami tvorili sieť (obr. 6) 10 % zvierat (tab. 1) malo EM III. Vyskytlo sa pri nej formovanie trombu, edém endotelu a deskvamácia epitelu pri výraznom purulentnom výpotku. V skupine s titrom protilátok >1:100 je väčšia pestrosť zistených zmien ako v predchádzajúcich skupinách. Vyskytla sa dilatácia lúmena žliaz a leukocyty v žľazách.



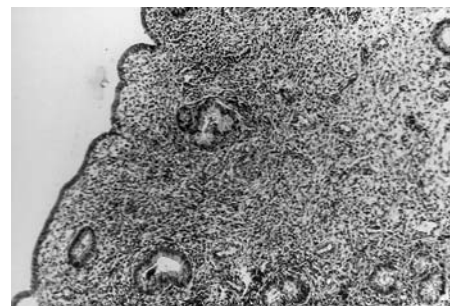
Obrázok 8. Voľné bunky v endometriu kráv (PN – polynukleárny leukocyt, MN – mononukleárny leukocyt, PB – plazmatická bunka, H – histiocyt).

Figure 8. Free cells in endometrium of cows (PN-polynuclear leucocyte, MN-mononuclear leucocyte, PB-plasmatic cell, H-histiocyte).



Obrázok 9. (Figure 9.)

Obrázok 9. Leukostáza pri EM II.; stroma (S), krvná cieva (Kc), fibrin(F), SEM, zv.8800x.



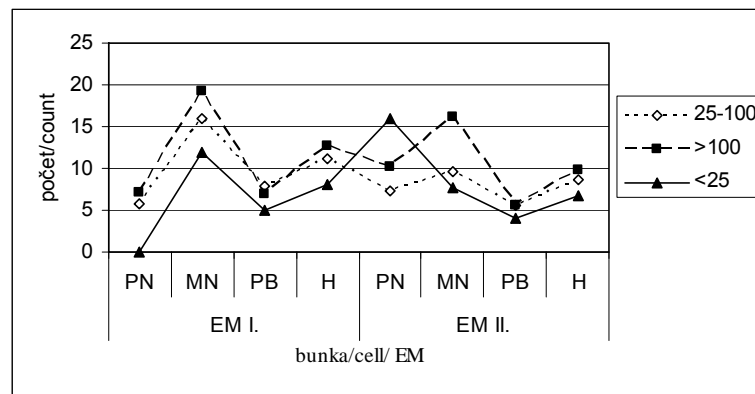
Obrázok 10. (Figure 10.)

Obrázok 10. Leukocytárna infiltrácia subepiteliálnej vrstvy pri EM III.; zelený trichróm, zv. x500.

Figure 9. Leucostasis in EM II.; stroma (S), blood vessel (Kc), fibrin(F), SEM, coating by gold, mag. x8800.

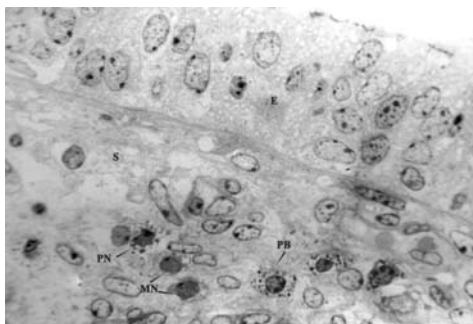
Figure 10. Leukocytare infiltrations of subepithelial layer in pri EM III.; Green trichrome, mag. x500.

Pri EM III. stupňa boli zmeny podobné ako pri nižšom titre. V bunkách sa neprejavila žiadna sekretorická aktivita. Mnoho buniek luminálneho epitelu hypertrofovalo do enormných rozmerov. Pri ciliárnych bunkách sa hypertrofia nepozorovala. V submikroskopickej štruktúre buniek medzi pestré zmeny strómy väčšiny zvierat patrila leukocytárna infiltrácia mononukleárneho charakteru, infiltrácia histiocytmi a plazmatickými bunkami (obr. 11). Z mononukleárných leukocytov sa vyskytovalo najviac malých foriem (5 - 8 μ m) lymfocytov (21.7 – 41.1 %). V menšom počte boli zastúpené histiocyty (19.4 – 26.8 %) a najnižší počet voľných buniek predstavovali plazmatické bunky(11.4 -19.5 %). Tento prejav v početnosti je zachovaný aj z hľadiska ich zastúpenia pri rôznej úrovni titra protilátok



Obrázok 11. Voľné bunky v endometriu kráv pri rôznej EM; (PN-polynukleárny leucocyt, MN-mononukleárny leucocyt, PB-plasmatická bunka, H-histiocyt).

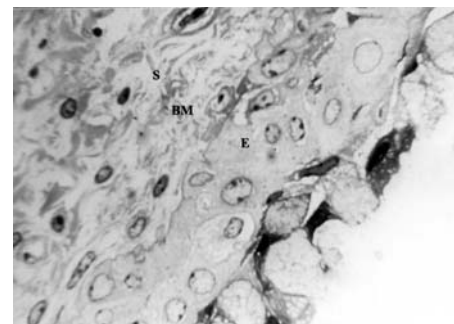
Figure 11. Free cells in endometrium of cows in different EM (PN-polynuclear leucocyte;MN-mononuclear leucocyte;PB-plasmatic cell;H-histiocyt).



Obrázok 12. (Figure 12.)

Obrázok 12. Edém buniek epitelu endometria (E), stróma (S), polynukleárny leukocyt (PN), mononukleárny leukocyt (MN), plazmatické bunky (PB), toluidínová modrá, zv. x1000.

Figure 12. Oedema of epitels` cells of endometrium; endometrium (E), stroma (S), polynuclear leukocyte(PN), mononuclear leukocyt (MN), plasmatic cells(PB)., Toluidine blue, mag. x1000.



Obrázok 13. (Figure 13.)

Obrázok 13. Edém sliznice krčka ;stróma (S), dezintegrácia buniek epitelu (E), bazálna membrána (BM), toluidínová modrá, zv.x1000.

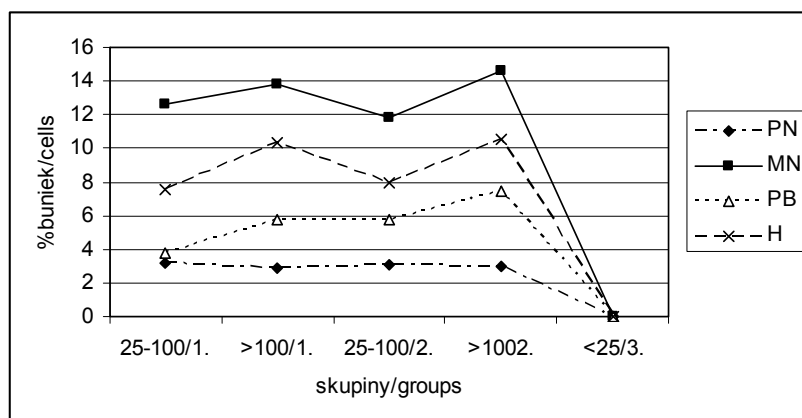
Figure 13. Oedema of the mucouse of cervix; stroma(S), desintegrations of the epitels` cells (E), basal membrane (BM), Toluidine blue, mag. x1000.

Pri vyššej úrovni titra sa zvyšoval aj výskyt voľných buniek, zvlášť lymfocytov. Frekvencia výskytu mononukleárov klesala s vyšším stupňom endometritídy a polynukleárne leukocyty sa zvyšovali so stupňom endometritídy. Výrazne dilatované žľazy mali aj výrazne hypertrofovaný žľaznatý epitel. Ich lúmen pri zvieratách s najvyšším titrom obsahoval okrem sekrétu aj solitárne bunky leukocytárneho

charakteru. Medzi bunčné priestory boli rovnako dilatované, akoby rozšírené edémom, čo vytváralo obraz diskontinuity epitelovej vrstvy a tým aj žľazy. Bazálna membrána žliaz v stratum functionale bola hrubšia a popretkávaná fibrínovými vláknami.

Zmeny sliznice krčka maternice

Pri zvieratách s úrovňou titra < 1:25 nebola zistená cervicitída a sliznica krčka vykazovala zmeny typické pre začiatok luteálnej fázy cyklu. Mikroskopické zmeny sliznice krčka maternice (1:25 -100) sú uvedené v tab. 3. Dominantnými zmenami boli polypózna hypertrofia epitelovej vrstvy, erózia epitelu, lokálne desquamácie epitelu, infiltrácia subepitelovej časti mononukleárnymi leukocytmi a perivaskulárne infiltrácie. Mikroštruktúrne zmeny boli obdobného charakteru ako pri endometriu (tabuľka 3), ale sa zmenila frekvencia a rozsah týchto zmien. Leukocytárna infiltrácia subepitelovej zóny sliznice krčka bola v porovnaní s endometriom odlišná (obr. 14) predovšetkým v prítomnosti polynukleárných leukocytov, ktoré sa vyskytovali v sliznici v menšej miere (8.4 -11.8 %). Pri zvieratách s titrom protilátok < 1:25 (3. skupina) sme v preparátoch sliznice krčka nezistili prítomnosť leukocytov.



Obrázok 14. Voľné bunky v sliznici krčka maternice kráv; (PN-polynukleárny leukocyt, MN-mononukleárny leukocyt, PB-plasmatická bunka, H-histiocyt).

Figure 14. Free cells in mucouse of the cervix uteri of cows; (PN-polynuclear leucocyte, MN-mononuclear leucocyte, PB-plasmatic cell, H-histiocyte).

Pri titre > 1:100 boli niektoré zmeny výraznejšie. Pri jednej dojnici sa nezistili žiadne submikroskopické zmeny charakteristické pre patologický proces. Hypertrofia epitelovej vrstvy prebiehala v polypóznej forme, kým v endometriu plošne. Táto forma dávala sliznici krčka kráterovitý vzhľad. Desquamácia epitelu na polypóznych úsekoch sliznice jej dávala trsovitý vzhľad. Na sliznici cervixu sme nenašli fibrinózne zmeny. Infiltrácia strómy pozostávala prevažne z mononukleárných leukocytov a iba v jej hlbších častiach boli pozorované aj polynukleáry. Erózia epitelu (obr. 3) mala podobný charakter ako v endometriu.

Tabuľka 3. Frekvencia mikroskopických zmien cervixu pri rôznej hladine titra protilátok (v %)

Table 3. The frequency of microscopic changes in the cervix at different levels of antibody titers (in %)

The changes	< 1:25	1:25-100	> 1:100
Polyp epithelial hypertrophy	-	88	100
Desquamation of the epithelium epithelu	-	72.2	88
Epithelial erosion	-	77.7	96
Infiltration of the stroma by LC	-	88.8	92
Perivascular infiltration	-	72.2	92
Low cells density	-	33.3	40
Karyolysis	-	50	52
Hyperchromatosis	-	33.3	36
Cytoplasmic vacuolation	-	22.2	16
Cisternae of GER	-	27.7	24
No changes	100	15	4

Diskusia

Infekčný proces reprodukčných orgánov môže byť vyvolaný nielen patogénnymi, ale aj potenciálne patogénnymi ba aj komenzálnymi mikroorganizmami (Otero et al., 2000; Ross, 2003; Rocha et al., 2004), ktoré žijú pri dobrej odolnosti zvieratá sním v zdanlivej symbióze. Ak sa zvieratá nachádzajú v nevhodných podmienkach je vznik infekcie veľmi aktuálny. Infekčný proces spôsobuje problémy pri fertilizácii, môže ovplyvniť cyklus, implantáciu zárodka a vyskytuje sa embryonálna mortalita (Parant, 1990), abort v rôznom štádiu vývoja plodu (Vlček, 1985, 1989), ale existuje aj možnosť priebehu celej gravidity aj s infekciou (Kaneene et al., 1986). Pôrod a puerpérium sú najkritickejšie momenty reprodukčného cyklu. Pri ich pravidelnom priebehu je bakteriálna kontaminácia likvidovaná samočistiacou schopnosťou a obranyschopnosťou organizmu. V prípadoch protrahovanej involúcie je vážnym problémom aj uplatnenie sa ubikvitárnych mikroorganizmov (Marcinkowski et al., 1989). Autori zistili ich významný podiel na málo výrazných puerperálnych endometritídach a na predĺženej SP až na 162 dní. Tento trend vidieť aj v našich sledovaniach, kde neboli zistené endometritídy I. stupňa pri klinických vyšetreniach v popôrodnom štádiu do 60. dňa, avšak podľa pitevného vyšetrenia sa ich výskyt pohyboval v rozpätí 9 -75 %. To sa prejavilo aj v aktuálnej sterilite, ktorá sa pohybovala od 126 do 154 dní. Tieto zistenia korešpondujú aj s údajmi Ruegg et al. (1988), ktorí pri stádach kráv s pozitívnym titrom zistili SP v priemere 117 dní a interval 86 dní. Autori zistili pri vysokej úrovni titra embryonálnu mortalitu, prípadne aborty, čo môžeme potvrdiť. Úroveň titra protilátok korešponduje s klinickými resp. patologickými nálezmi na slizniciach reprodukčných orgánov kráv (Luginbuhl, 1981; Klavano, 1980; Corbeil et al., 1986), hoci pri porovnaní titra, klinických zmien a získaných pozitívnych izolátov existujú stále určité nejasnosti (Stephens et al., 1986; Kwiecien and Litte, 1991). Uvedený fakt môžeme tiež potvrdiť z pozitívnych izolátov pri klinicky nediodagnostikovaných cervicitídach a endometritídach. Na druhej strane vidieť, že klinicky stanovená diagnóza nevystihuje skutočný stav a má podstatne nižšiu vypovedaciu hodnotu ako histologické vyšetrenie. Toto potvrdzujú aj bitúnkové

nález Weissera a Alberta (1987) a Millera et al. (1983). Lederer et al. (1987) dokumentuje množenie *H. somnus* v mononukleárných fagocytoch, ktoré sa po vyplnení fagocyta patogénom rozpadajú a tak dochádza k jeho transportu na rôzne časti tkanív orgánov. Tie isté typy buniek, ktoré sú schopné usmrtiť iné typy baktérií nie sú schopné zneškodniť *H. somnus*, ale v skutočnosti umožnia jeho rast a rozmnoženie. Už pri 4 hodinovej kultúre autor zistil ingesciu mikroorganizmu fagocytmi a po 8 hodinách jeho pomnoženie a následný rozpad mononukleárov. Patogenita *H. somnus* je spájaná tak s akútnymi, ako aj chronickými zápalovými procesmi reprodukčných orgánov kráv (Kaneene et al., 1986 a,b; Stephens et al., 1986; Kwiecien and Little 1991; Patterson et al., 1998). Pri leukocytoch získaných lávážou maternice boli v prevahe polynukleárne leukocyty, ale tak ako pri ostatných sledovaných zvieratách pri chronických procesoch v tkanivách endometria a cervixu prevažovali mononukleárne leukocyty, čo by nasvedčovalo spomínanému zisteniu Lederer et al. (1986). Rovnako pri spontánnych ako aj pri experimentálnych infekciách *H. somnus* sú pri charakteristike histopatologických zmien v literárnych údajoch popísané zmeny tkanív reprodukčných orgánov iba v základnej rovine charakterizujúcej daný stav, no iba zriedka sa stretáme s podrobnou histologickou a mikroštrukturálnou charakteristikou (Klavano, 1980; Miller and Barnum, 1983; Patterson et al., 1986; Kaneene et al., 1987), aká sa nachádza v našej práci. Takéto podrobné štúdie sú uvádzané viac v súvislosti s abortami (Widders et al., 1986) a embryonálnou mortalitou (Van Dreumel and Kierstead, 1975; Corboz and Wild, 1981; Czuprynski and Hamilton, 1985; Chiang et al., 1986; Hubbard et al., 1986; Corbeil et al., 1986; Patterson et al., 1998). Aj keď existujú určité spoločné charakteristické znaky pre jednotlivé formy zápalových procesov (Bednář et al., 1984), existujú zvláštnosti vzniknuté v dôsledku povahy etiologického činiteľa (Jirásek, 1984) a lokalizácie zápalového procesu (Serov et al., 1986). Tieto diferencie sú najmarkantnejšie pri bakteriálnej etiológii. V orgánoch ktoré prechádzajú pravidelnými cyklickými zmenami, môžu byť niektoré charakteristické symptómy zastreté resp. poznačené cyklickou zmenou, ktorá práve na danom tkanive prebieha (Kobilková a Siracký, 1990). Holý a Kudláč (1977), podobne ako Gamčík et al. (1980) popisujú zápalový proces na endometriu kráv predovšetkým ako chronický. Endometritídy zhodne delia do štyroch stupňov podľa ich charakteru. Ako najčastejšie príčiny endometritíd mikrobiálneho pôvodu uvádza podmienenčne patogénnu mikroflóru. Pri endometritídach a cervicitídach uvádzaných v súvislosti s infekciou volanou *H. somnus* je zápalový proces charakterizovaný ako akútny (pri experimentálnych infekciách), ale prevažne ako chronický katarálny, mukopurulentný a zriedkavo aj purulentný pri spontánnych infekciách reprodukčných orgánov. Pri purulentnej forme (malý počet zvierat) sme sa stretli iba so zmiešanou infekciou a tak je ťažko vysloviť jednoznačný názor na príčinu, resp. rozhodujúci etiologický moment. Pri endometritíde II. stupňa sa pri zvieratách s titrom protilátok vyšším ako 1:25 vyskytoval fibrinózny zápal endometria, s čím sme sa v dostupnej literatúre nestretli pri popise symptomatiky endometritíd. Takýto stav v mikroštrukturálnych zmenách popisuje pri hemofilovom chronickom supuratívnom zápalovom procese baranov Díaz-Aparício et al. (2009), ktoré s výskytom neorganizovaných fibrinóznych zmien zisťovali pri epididimitíde baranov. Pri placentitíde a endometritíde sprevádzanej abortom popisuje Widders et al. (1986) fibrínové tromby v malých venulách placenty a endometria. Pri mukopurulentnej forme je viac popisovaná desquamácia epitelovej vrstvy (Kaneene et al., 1987), ktoré sme my častejšie zisťovali (72.7 % resp. 84.6 %) pri katarálnej endometritíde, podobne ako pri katarálnych cervicitídach. S desquamáciou epitelu sme sa nestretli

v skupine s najnižšou úrovňou titra, hoci Patterson et al. (1984) popisuje squamózne defekty aj na slizniciach iných orgánov pri titroch nižších ako 1:20. Díaz-Aparício et al. (2009) zistili rovnaké desquamačné zmeny a eróziu epitelu v chvoste prisemenníka baranov pri hemofilovej infekcii. Proliferácia endometria, peristatická hyperémia, hypertrofia epitelu a perivaskulárne leukocytárne infiltrácie sa popisujú ako sprievodné symptómy zápalového procesu (Bednář et al., 1984; Jirásek, 1984). Pri sledovaných zvieratách s výnimkou prvej skupiny, sme pri všetkých zvieratách zistili spomenuté histopatologické znaky. Infiltrácia strómy je väčšinou spájaná s polynukleárnymi (Widders et al., 1986; Kaneene et al., 1987), pri baranoch aj pri epidimitídach hemofilovej etiológie (Díaz-Aparicio et al., 2009). Mononukleárne infiltrácie s malým zastúpením polynukleárov zistil podobne ako my aj Hoblet et al. (1989), hoci je mononukleárna infiltrácia spájaná viac s vírusovými infekciami (Bednář et al., 1984; Kudláč, 1985). Ak uvážime funkciu mononukleárov pri tkanivovej imunite a ich prítomnosť ako živnú pôdu pre množenie sa *H. somnus*, je pravdepodobné, že ich prítomnosť v tkanive nie je náhodná aj napriek tomu, že ide o bakteriálnu infekciu. S obráteným pomerom poly a mononukleárov, t.j. prevahou polynukleárov sme sa stretli pri sekrétoch získaných lavážou endometria pri spontánnej infekcii (60.1 % PN oproti 38.9 % MN). Podľa našich zistení sa zdá, že pri hemofilovej infekcii je infiltrácia plazmatickými bunkami, histiocytmi a malými formami lymfocytov patognomickým symptómom. Do istej miery to potvrdzujú in vitro štúdie Lederera et al. (1987), ktorí popisujú závislosti týchto buniek s antigenitou mikroorganizmu. V tejto súvislosti je obdobne hodnotený aj výskyt edému endotelu v kapilárach endometria (Thomson and Little, 1981; Sylte et al., 2000), ktorý mal v našich sledovaniach značnú frekvenciu (50 -100 %), ale treba poznamenať, že iba pri zvieratách s vyšším titrom ako 1:25. Vaskulitídy (Sylte et al., 2000; Haris and Hansen, 2000), edémy endotelu ciev (Thomson and Little, 1981), trombotizáciu ciev (Janzen, 2012), vakuolizáciu buniek a bunecných membrán endotelových buniek (Thomson and Little, 1981), kondenzáciu chromatinu leukocytov (Sylte et al., 2000) sme mohli pozorovať aj my na rozdiel od Gomis et al. (1998), ktorí kondenzáciu chromatinu nenašli. Pri cervicitídach a endometritídach hemofilového pôvodu sme sa nestretli v literatúre s popisom erózií epitelu, ktoré sa v plnom rozsahu prejavili pri fibrinózných procesoch a vo veľkom rozsahu (80.0 %) pri katarálnych zápalových stavoch. Je zaujímavé, že táto zmena bola zistená aj v skupine s najnižším titrom oproti iným často intenzívnejším a skôr spomínaným znakom. Tak ako pri každom zápalovom procese aj pri hemofilovej infekcii je vidieť pomerne pestré zastúpenie zmien tkanív orgánov a je prakticky nemožné bez mikrobiologického, hematologického a histologického vyšetrenia vysloviť iba na základe klinických zmien diagnózu. Dokonca aj pri mikrobiologickom vyšetrení sa častejšie stretávame so zmiešanými infekciami a je ťažko povedať čo bolo prioritným pri z hľadiska etiológie a patogenézy. V každom prípade by sa mala tejto infekcii venovať omnoho väčšia pozornosť, zvlášť pri opakujúcich sa zápaloch, pri častých vaginitídach, pri ťažko liečiteľných endometritídach a v prípadoch keď sa v chove vyskytujú aj respiračné a enterálne problémy narodených teliat počas prvých 14 dní ich života.

Acknowledges

Research was founded by Grant 95/195/190.

References

- Bednář, B., (1984): Patológia. Učebnica pre lekárske fakulty. Bratislava: Osveta.
- Challacombe, J.F., Duncan, A.J., Brettin, T.S., Bruce, D., Chertkov, O., Detter, J.C., Han C.S., Misra, M., Richardson, P., Tapia, R., Thayer, N., Xie, G., Inzana, T.J., (2007) Complete genome sequence of *Haemophilus somnus* (*Histophilus somni*) strain 129Pt and comparison to *Haemophilus ducreyi* 35000HP and *Haemophilus influenzae* Rd. *Journal of Bacteriology*, 189(5),1890–1898. DOI: 10.1128/JB.01422-06
- Cheong, S., Nydam, D., Galvao, K., Gilbert, R., (2008) Prevalence of Subclinical Endometritis in Lactating NewYork State Dairy Cows Shortly Before First Service. *Hungarian Veterinary Journal*, 130(Suppl. II), 156 pp.
- Chiang, Y.W., Kaeberle, M.L., Roth, J.A., (1986) Identification of suppressive Components in *Haemophilus somnus* fractions which inhibit bovine polymorphonuclear leukocyte function. *Infection and Immunity*, 52(3), 792–797.
- Chladek, D.W.,(1975) Bovine abortion associated with *Haemophilus somnus*. *American Journal of Veterinary Research*, 36(7),1041-1041.
- Corbeil, L.B., Widders, P.R., Gogolewski, R., Artur, J., Inzana, T.J., Ward, A.C.S., (1986) *Haemophilus somnus*: Bovine reproductive and respiratory disease. *Canadian Veterinary Journal*, 27(2), 90–93.
- Corboz, L., Wild, P., (1981) Epidemiologie der *Haemophilus somnus* – Infektionen beim rind: Vergleich von Stämmen in der Polyacrylamidegel-Electrophorese(PAGE). *Schweizer Archiv fuer Tierbreilkunde*, 123(2),79–88.
- Czuprinski, C.J. , Hamilton, H.J., (1985) Bovine neutrophils ingest but not kill *Haemophilus somnus* in vitro. *Infection and Immunity*, 50(2), 431–436.
- Díaz-Aparicio, E., Tenorio-Gutiérrez, V. R., Arellano-Reynoso, B., Enríquez-Verdugo, I., Aguilar-Romero, F., (2009) Pathogenicity of different strains of *Histophilus somni* in the experimental induction of ovine epididymidis. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 73(2),157–160.
- Gamčík, P., Sakala, J., Lojda, L., (1980) Plodnosť hovädzieho dobytka a jej poruchy. *Príroda*: Bratislava.
- Harris, F.W., Janzen, E.D., (1989) The *Haemophilus somnus* disease complex (*Hemophilosis*) : A review. *Canadian Veterinary Journal*, 30(10), 816–822.
- Hoblet, K.H., Haibel, G.K., Kowalski, J.J., Rojko, J.L., (1989) Culture-positive persistence and serum agglutinating antibody response after intrauterine inoculation of *Haemophilus somnus* in virgin heifers. *American Journal of Veterinary Research*, 50(7),1008–1014.
- Holý, L., Kudláč E., (1977) Veterinárni porodnictví a gynekologie. Praha: Státní zemědělské nakladatelství.
- Hubbard, R.D., Kaeberle, M.L., Roth, J.A., Chiang, Y.W.,(1986) *Haemophilus somnus*-induced interference with bovine neutrophil functions. *Veterinary Microbiology*, 12(1),77–85. DOI: 10.1016/0378-1135(86)90043-X
- Jánosi, K., Hajtós, I., Makrai, L., Gyuranecz, M., Varga, J., Fodor, L., (2009) First isolation of *Histophilus somni* from goats. *Veterinary Microbiology*, 133(4), 383–386. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.07.010

- Janzen, E.D., (2012) Overview of Histophilosis. Merck Veterinary Manual [online] Available at: http://www.merckmanuals.com/vet/generalized_conditions/histophilosis/overview_of_histophilosis.html [Accessed 15 August 2013]
- Jirásek, J.E., (1984) Endometrial biopsy. Praha: Avicenum.
- Kaneene, J.B., Coe P.H., Gibson, C.D., Yamini B., Martines, R.O. Morrow, D.A., (1986a) The role of *Haemophilus somnus* in bovine early embryonic death I. The effect of the organism on embryos by day 8 post breeding. *Teriogenology*, 26(2), 198–198.
- Kaneene, J.B., Gibson, C.D., Coe, E.P.H., Morrow, D.H.A., (1986b) The role of *Haemophilus somnus* in bovine early embryonic death. II. Persistence of the organism in the uterus following intrauterine exposure. *Teriogenology*, 26(6), 795–801.
- Kaneene, J.B., Coe, P.H., Gibson, C.D., Yamini, B., Morrow, D.A., Martines, R.O., (1987) The role of *Haemophilus somnus* in bovine early embryonic death III. The effect of the organism on embryos by day 21 post breeding, *Teriogenology*, 27(5), 737–749.
- Klavano, G.G. (1980) Observations of *Haemophilus somnus* infection as an agent producing reproductive diseases: Infertility and abortion, pp. 139-149. *Proc Annu Meet SOC Teriogenology* Sept.,
- Kobilková J, Siracký J., (1990) *Cytodiagnostika v gynekologii*. Praha: Avicenum.
- Kudláč, E., (1985) Vliv některých virových infekcí na reprodukci skotu. *Veterinářství*, 5(4), 35–44.
- Kwiecien, J.M., Little, P.B., (1991) *Haemophilus somnus* and reproductive disease in the cow: A review. *Canadian Veterinary Journal*, 32(10), 595–601.
- Last, R.D., Macfarlane, M.D., Jarvis, C.J., (2001) Isolation of *Haemophilus somnus* from dairy cattle in Kwa Zulu-Natal. An emerging cause of "dirty cow syndrome" and infertility? *Journal of South African Veterinary Association*, 72(2), 95. DOI: 10.4102/jsava.v72i2.625
- Lederer, J.A., Brown, J.F., Chrles J., Czuprinski, C.J., (1987) *Haemophilus somnus* a facultative intracellular pathogen of bovine mononuclear phagocytes. *Infection and Immunity*, 55(2), 381–387.
- Luginbuhl, A., Kupfer, U., Nicolet, J., (1981) Bakteriologische behunde im eschlechtsappart von kuclen im puerperium. *Schweizer Archiv fuer Tierbreilkunde*, 123, 629–637.
- Marcinkowski, K., Dejneka, J., Rauluski-Ewicz, S., Samborski, Z., Stehlík, Z., (1989) Některá onemocnění krav v poporodním období a jejich vztah k další plodnosti. In Marcinkowski, K : Aktuální problémy reprodukci skotu a odchov telat s minimální nemocností. Brno: Vysoká škola veterinární.
- Miller, R.B., Barnum, D.A., (1983) Effect of *Haemophilus somnus* on the pregnant bovine reproductive tract and conceptus following cervix infusion. *Veterinary Pathology*, 20, 584–589. DOI: 10.1177/030098588302000510
- Otero, C., Saavedra, L., Silva de Ruiz, C., Wilde, O., Holgado, A.R., Nader-Macías, M.E., (2000) Vaginal Bacterial Microflora Modifications During the Growth of Healthy Cows. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 251–254. DOI: 10.1046/j.1365-2672.200.00809.x

- Palomares, G., Aguilar, F., Hernández, L., Acosta, J., Herrera, E., Tenorio, V., (2005) Isolation and characterization of *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) in semen samples of rams with epididymitis. *Small Ruminant Research*, 60, 221–225. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2004.12.010
- Parant, M., (1990) Possible mediators in endotoxin- induced abortion. *Research in Immunology*, 141, 164–168. DOI: 10.1016/0923-2494(90)90137-N
- Patterson, R.M., Hill, F., Shiel, M.J., Humphrey, J.D., (1984) Isolation of *Haemophilus somnus* from vaginitis and cervicitis in dairy cattle. *Australian Veterinary Journal*, 61, 301–302. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1984.tb06022.x
- Richey, E.J., (2002) *Haemophilus somnus* disease in cattle [online]. Available at: [http://www.vetmed.vt.edu/education/Curriculum/VM8304/vet%20pathology/CASE S/haemophilus%20somnus%20Disease%20in%20Cattle.htm](http://www.vetmed.vt.edu/education/Curriculum/VM8304/vet%20pathology/CASE%20S/haemophilus%20somnus%20Disease%20in%20Cattle.htm) [Accessed 18 August 2013].
- Rocha, A.A., Gambarini, M.L., Andrade, M.A., Dias de Oliveira-Filho, B., Araújo-Gomes, F., (2004) Microbiota cérvico-vaginal durante o final de gestação e puerpério em vacas Girolando. *Ciencia Animal Brasileira*, 5, 215–220.
- Ross, H.J., (2003) Bacterial and Fungal Organisms in the Vagina of Normal Cows and Cows with Vaginitis. Master Thesis. Texas: A&M University.
- Ruegg, P., Marteniuk, J.V., Kaneene, J.B., (1988) Reproductive difficulties in cattle with antibody titers to *Haemophilus somnus*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 193 (8), 941-942.
- Sassi, G., Ismail, S., Fodor, L., Karen, A., Tibold, J., Mádl, I., Szenci, O., (2010) Incidence of *Histophilus somni* in purulent vaginal discharges in a Hungarian Holstein-Friesian dairy farm. In *Proceedings of the XXVI World Buiatrics Congress*, Nov. 14-18, 2010, Santiago de Chile.
- Serov, V.V., et al., (1986) *Patologičeskaja anatomija: Atlas*. Moskva: Izdatelstvo Medicina.
- Stephens, L.R., Slee, K.J., Polton, P., Larcombe, M., Kosior, E., (1986) Investigation of purulent vaginal discharge in cow with particular reference to *Haemophilus somnus*. *Australian Veterinary Journal*, 63(6), 182–185. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1986.tb02969.x
- Sylte, M.J., Corbeil, L.B., Inzana, T.J., Czuprynski, C.J., (2001) *Haemophilus somnus* Induces Apoptosis in Bovine Endothelial Cells In Vitro. *Infection and Immunity*, 69(3), 1650–1660. DOI: 10.1128/IAL69.3.1650-1660.2001
- Šnirc, J., Lacková, D., Šťastný, P., (1992) Výskyt špecifických protilátok proti *Haemophilus somnus* v chovoch kráv s výskytom reprodukčných porúch. In *Zborník referátov, XIII medzinárodná konferencia o reprodukcii hospodárskych zvierat*. máj, Nitra: Vysoká škola poľnohospodárska.
- Šťastný, P., Šnirc, J., Lacková, D., Golian, J., (1994) The experimental model of reproduction form carried out by *Haemophilus somnus*. In *Proceeding book, The International Conference on Farm Animal Reproduction*, máj, Nitra: Slovak University of Agriculture.
- Tam, Ch., (2011) *Haemophilus somnus* [online]. Available at: http://microbewiki.kenyon.edu/index.php?title=Haemophilus_somnus&oldid=65025 [Accessed 21 August 2013].
-

Šťastná and Šťastný: Microstructural Changes Of Cows' Uterus In An Infection Caused...

- Thomson, H.G., Little, P.B., (1981) Effect of *Haemophilus somnus* on bovine endothelial cells in organ culture. *American Journal of Veterinary Research*, 42(5),748–754.
- Van Deuren, M., Dofferhoff, A. S. M., Van Der Meer, J. W. M., (1992) Cytokines and the response to infection. *Journal of Pathology*, 168, 349–356. DOI: 10.1002/path.1711680403
- Van Donkersgoed, (2007) Health Management: Haemophilosis. In Alberta Feedlot Management Guide. 2nd ed. Barrhead: Feeder Associations of Alberta Ltd.
- Van Dreumel, A.A., Kierstead, M., (1975) Abortion associated with *Hemophilus somnus* infection in a bovine fetus. *Canadian Veterinary Journal*, 16(12), 367–370.
- Vlček, Z., (1985) Význam některých bakteriálních infekcí v etiologii poruch reprodukce skotu. *Veterinářství*, 35(4),s 10-12 .
- Vlček, Z., (1985) Bakteriologické a mykologické nálezy v pohlavním ústrojí krav po porodu a jejich vztah k reprodukci. In *Reprodukce chovu skotu ve vztahu k výživě*, september, Gottwaldov.
- Ward, A.C.S., Weiser, G.C., Anderson, B.C., Cummings, P.J., Arnold, K.F., Corbeil, L.B., (2006) *Haemophilus somnus (Histophilus somni)* in bighorn sheep. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 70(1), 34–42.
- Weiser, W., Albert, K., (1987) *Haemophilus somnus* und *Corynebacterium pyogenes* Vorcomen im Vaginalsecret fruchtbarkeitsgestorten rinder in Mordwurttemberg. *Tierärztliche Umschau*, 42, 596–600.
- Widders, P.R, Paisley, L.G, Gogolewski, R.P., Evermann, J.F., Smith, L.B., Corbeil, J. W., (1986) Experimental abortion and the systemic immune response to *Haemophilus somnus* in cattle. *Infection and Immunity*, 54(2),555–560.